



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 40 263 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁶:
G 01 N 33/543
G 01 N 33/53
G 01 N 33/68
C 12 Q 1/68

②1 Aktenzeichen: 197 40 263.1
②2 Anmeldetag: 12. 9. 97
④3 Offenlegungstag: 7. 5. 98

DE 197 40 263 A 1

③0 Unionspriorität:
739396 31. 10. 96 US

⑦1 Anmelder:
Hewlett-Packard Co., Palo Alto, Calif., US

⑦4 Vertreter:
Schoppe, F., Dipl.-Ing.Univ., Pat.-Anw., 81479
München

⑦2 Erfinder:
Schembri, Carol T., San Mateo, Calif., US

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Kachelungsverfahren zum Bauen eines chemischen Arrays

⑤7 Ein Verfahren zum Bauen eines Arrays von chemischen Moietäten weist den Schritt des Bildens mehrerer eigener physischer Entitäten (Kacheln) aus einem im wesentlichen planaren Material mit einer oder mehreren Spezies einer chemischen Moietät, die an demselben angebracht sind, und den Schritt des Aufnehmens und Plazierens der Entitäten (Kacheln) auf stabiler Art und Weise auf einem Träger an räumlich eigenen feststellbaren Positionen auf, um ein Array von chemischen Moietäten zu bilden. Das gebildete Array umfaßt zumindest zwei Spezies einer chemischen Moietät und vorzugsweise von etwa 50 bis zu etwa 1000 Spezies. Die beanspruchte Erfindung umfaßt ferner ein Array, das durch dieses Verfahren gebildet worden ist.

DE 197 40 263 A 1

Diese Erfindung bezieht sich allgemein auf ein Verfahren zum Bilden eines Arrays von bioorganischen Molekularsonden auf einem Träger, und auf ein Array, das durch dieses Verfahren gebildet wird.

Arrays von immobilisierten Sonden werden gegenwärtig zur Verwendung in Untersuchungen entwickelt, um Komponenten in biologischen Proben zu erfassen und zu identifizieren, und um Molekularbibliotheken zu sieben. Die Fähigkeit mehrere Spezies von Molekülen in einem einzigen Untersuchungstest auszusieben, ist besonders wertvoll zwecks der Drogenentdeckung und für die klinische Genetik. Daher wurden Arrayherstellungstechnologien entwickelt, um es zu ermöglichen, daß eine große Anzahl von unterschiedlichen Sonden an getrennten und bekannten Orten in einem Array enthalten sind (siehe z. B. Fodor u. a., *Science* 251, 767-773 (1991); Southern u. a., *Nucleic Acids Research* 22 : 1368-1373 (1994); US-Patent Nr. 5,510,270; US-Patent Nr. 5,474,796; US-Patent Nr. 5,429,807; und US-Patent Nr. 5,472,672). Bei diesen bekannten Verfahren werden die Sondenmoleküle an vorbestimmten Orten auf einer festen Trägeroberfläche an Ort und Stelle, d. h. in situ, synthetisch hergestellt.

Es existieren Nachteile, wenn ein Array auf diese Art und Weise gebildet wird, besonders wenn das Array Biopolymere, wie z. B. Oligonukleotide, aufweist. Das In-Situ-Verfahren, das gegenwärtig für die kommerzielle Herstellung von Oligonukleotid-Arrays verwendet wird, ist nicht für die effiziente Herstellung von Arrays aus Langkettenpolymeren geeignet, und zwar aufgrund der Anzahl von Verlängerungszyklen, welche benötigt werden, und aufgrund des variablen Wirkungsgrads jedes Anfügungsschritts. Um beispielsweise n Spezies von Oligonukleotiden mit m variablen Positionen synthetisch herzustellen, werden $n \times m$ Verlängerungszyklen benötigt. Obwohl Lösungen entwickelt wurden, um die Zeit des Gesamtverfahrens zu verkürzen, indem Gruppen von Stellen für das gleichzeitige Hinzufügen eines gegebenen Nukleotides getrennt wurden (siehe z. B. Frank u. a., *Nucleic Acids Res.* 11, 4365-4377 (1983); US-Patent Nr. 5,510,270), ist die Herstellung eines Arrays auf diese Art und Weise ineffizient, besonders wenn das erwünschte Array Hunderte von unterschiedlichen Sondensequenzen und Sondenlängen von über 300 Nukleotiden enthalten soll. Jeder Anfügungsschritt erfordert eine begrenzte Zeit zur Bildung einer kovalenten Bindung, und jedem ist eine Fehlerquote zwischen 2% und 15% zugeordnet. Die Probleme bei der Sondenreinheit erfordern einen hohen Pegel an Sondenredundanz, wobei ferner Fehler manchmal erst nach der Herstellung des gesamten Arrays entdeckt werden können.

Wenn Reagenzien ferner als Mikrotröpfchen aufgebracht werden, müssen Vorkehrungen unternommen werden, um eine Mischung chemischer Moietäten in benachbarten Tröpfchen zu vermeiden, und zwar entweder durch genaues Aufbringen des Tröpfchens an seinem bestimmten Anfügungsplatz, oder durch Bilden einer Struktur von differentiellen Polaritäten auf der Anbringungsfläche, um die Tröpfchen mittels der Oberflächenspannung auf ihre bezeichneten Anbringungsregionen zu begrenzen.

Es wird ein Verfahren zum Bilden eines Arrays mit Sonden bekannter hoher Reinheit benötigt, bei dem die Anbringungschemie für jede unterschiedliche Sonde in dem Array unabhängig optimiert werden kann, wobei die Dichte jedes Typs der angebrachten Sonde vor dem Arraybilden qualitativ beurteilt werden kann, wobei Sonden, welche die Spezifikationen nicht erfüllen, korrigiert oder entfernt werden können, und zwar vor dem Aufbau des Arrays. Die Anzahl von Gesamtschritten, die erforderlich ist, um den Array zu

bilden, soll bei diesem Verfahren im Vergleich zu bekannten Verfahren reduziert werden.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, ein Verfahren zum Aufbauen eines Arrays von chemischen Moietäten, ein Verfahren zum Aufbauen eines Arrays von bioorganischen Molekularsonden und ein Array von zumindest zwei Spezies einer chemischen Moietät zu schaffen, welche effizient und dennoch zuverlässig hergestellt werden können bzw. arbeiten.

Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung besteht darin, daß die gesamte Anzahl von Schritten, welche erforderlich sind, um das Array herzustellen, beim erfindungsgemäßen Verfahren im Vergleich zu bekannten Verfahren verringert wird, und daß die Gesamtanzahl der Tests, die erforderlich sind, um die Qualität der hergestellten Arrays sicherzustellen, gleich der Anzahl von Sonden in dem Array und nicht gleich der Anzahl von erzeugten Arrays ist.

Ein erfindungsgemäßes Verfahren zum Aufbauen eines Arrays von chemischen Moietäten umfaßt das Bilden mehrerer Kacheln, die aus einem im wesentlichen planaren Material bestehen, wobei an jeder Kachel zumindest eine Spezies einer chemischen Moietät angebracht ist, und das Aufnehmen und Platzieren jeder Kachel auf stabile Art und Weise auf einem Träger an einem getrennten und eigenen räumlichen Ort, um ein Array von chemischen Moietäten zu bilden. Das durch dieses Verfahren gebildete Array umfaßt zumindest zwei Spezies einer chemischen Moietät und vorzugsweise etwa 50 bis zu etwa 1.000 Spezies einer chemischen Moietät. Die chemischen Moietäten sind vorzugsweise bioorganische Molekularsonden, und am bevorzugtesten Nukleinsäuren, Proteine, Polysaccharide und Lipide.

Ein Ziel dieser Erfindung besteht darin, die Geschwindigkeit und Reproduzierbarkeit des Arrayherstellungsverfahrens zu erhöhen, indem vorher synthetisch hergestellte Sonden an diskreten physischen Entitäten angebracht werden können, welche robotisch bewegt werden können, um vorbestimmte Positionen auf einem Träger zu trennen, um das Array herzustellen. Der Anbringungsschritt wird vorzugsweise auf stapelartige Weise ausgeführt, um die Verbindungsschemie und die Anbringungsichte jedes Typs der Sonde in einem Array unabhängig von dem Zusammenbau des Arrays zu optimieren.

Ein dazu verwandtes Ziel besteht darin, eine Einrichtung zum Optimieren der Verbindungsschemie und der Anbringungsichte jedes Sontentyps in dem Array unabhängig von dem Zusammenbau des Arrays zu optimieren.

Noch ein weiteres Ziel dieser Erfindung besteht darin, die Qualitätssteuerungsprozedur zu rationalisieren, und die Kosten zum Herstellen eines Arrays mit einem hohen Grad an chemischer Komplexität zu verringern. Die Reinheit der Synthese jedes Sontentyps in dem Array und die Dichte der Befestigung desselben können vor dem Kacheln des Arrays verifiziert werden. Die gesamte Oberfläche einer eigenen physischen Entität kann vor dem Unterteilen derselben in Hunderttausende von Kacheln zum Platzieren in Hunderttausenden von Arrays getestet werden, wodurch die frühe Erfassung und Korrektur von Herstellungsproblemen möglich wird.

Bevorzugte Ausführungsbeispiele der vorliegenden Erfindung werden nachfolgend bezugnehmend auf die beiliegenden Zeichnungen detaillierter erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 auf schematische Art und Weise die Schritte, die bei dem Verfahren zum Bilden eines Arrays dieser Erfindung vorhanden sind; und

Fig. 2 ein Ausführungsbeispiel des Arrays, bei dem die Kacheln auf einer Trägeroberfläche zylindrisch angeordnet sind.

Vor der detaillierten Beschreibung der Erfindung sei dar-

auf hingewiesen, daß diese Erfindung nicht auf spezielle Komponententeile oder Verfahrensschritte der beschriebenen Verfahren begrenzt ist, da Teile und Verfahren variieren können. Es sei ebenfalls darauf hingewiesen, daß die hierin verwendete Terminologie nur zur Beschreibung von speziellen Ausführungsbeispielen dient, und daß sie nicht begrenzend sein sollte. Bezüglich der Verwendung in der Beschreibung und den beigefügten Ansprüchen umfassen die Singularformen "ein" und "der, die, das" Pluralbegriffe, es sei denn, daß der Kontext deutlich etwas anderes zeigt.

In dieser Beschreibung und den folgenden Ansprüchen wird eine Anzahl von Begriffen verwendet, welche nachfolgend definiert sind.

Ein "Array" ist eine Anordnung von Objekten in einem Raum, wobei jedes Objekt eine getrennte vorbestimmte räumliche Position einnimmt. Jedes der Objekte in dem Array dieser Erfindung umfaßt eine oder mehrere Spezies einer chemischen Moietät, die an einer "eigenen physischen Entität" angebracht ist, derart, daß der physische Ort jeder Spezies bekannt ist oder feststellbar ist. Eine "eigene physische Entität" ist eine Einheit aus im wesentlichen planarem Material (z. B. einem festen Material, einer Membran, einem Gel oder einer Kombination der Materialien), die gehandhabt werden können, und die doch ihre Identität bewahren, und die in "Kacheln" unterteilt werden können, um auf verschiedene Arten und Weisen neu kombiniert zu werden, um ein physisches Array zu bilden. Vorzugsweise werden die Kacheln regelmäßige geometrische Formen haben, wie z. B. einen Sektor eines Kreises, ein Rechteck und dergleichen, wobei radiale oder lineare Abmessungen im Bereich von etwa 100 µm bis zu etwa 10 mm reichen und vorzugsweise im Bereich von etwa 250 µm bis zu etwa 1.000 µm liegen. Die Unterteilung der Entität in Kacheln kann entweder vor oder nach Anbringung der chemischen Moietät und durch irgendein geeignetes Verfahren zum Schneiden der Entität, z. B. mit einer Chipzerteilungssäge, erfolgen. Diese Verfahren sind bei der Halbleiterchipherstellung bekannt und können durch Fachleute für das spezielle Material, das zur Verwendung bei dieser Erfindung ausgewählt wird, optimiert werden.

Ein "Träger" ist eine Oberfläche oder Struktur für die Anbringung von Kacheln. Der "Träger" kann jede erwünschte Form und Größe haben, und derselbe kann aus einer Vielzahl von Materialien hergestellt werden. Das Trägermaterial kann für eine Biokompatibilität behandelt werden (d. h. um biologische Proben und Sonden vor unerwünschten Struktur- oder Aktivitätsänderungen beim Kontakt mit der Trägeroberfläche zu schützen), und um eine nicht-spezifische Bindung biologischer Materialien an dem Träger zu reduzieren. Diese Verfahren sind in der Technik bekannt (siehe z. B. Schöneich u. a., Anal. Chem. 65 : 67-84R (1993)). Die Kacheln können an dem Träger mittels eines Klebstoffs, durch Einführen in eine Tasche oder in einen Kanal, der in dem Träger gebildet ist, oder durch irgendeine andere Einrichtung, die eine stabile und sichere räumliche Anordnung schaffen wird, angebracht werden.

"Kacheln" ist das Verfahren zum Bilden eines Arrays durch Nehmen und Plazieren einzelner Kacheln, die einzelne oder mehrere Spezies chemischer Moietäten umfassen, auf einem Träger in einer festen Raumstruktur oder einem festen Raummuster.

Eine "chemische Moietät" ist ein organisches oder anorganisches Molekül, das zum Zeitpunkt der Anbringung an einer diskreten physischen Moietät vorgeformt ist, im Unterschied zu einem organischen Molekül, das in Situ auf einer Arrayoberfläche synthetisch hergestellt wird. Die bevorzugte Art und Weise zum Anbringen besteht in einer kovalenten Bindung, obwohl auch nicht-kovalente Anbringungs-

einrichtungen oder eine Immobilisierung abhängig von dem speziellen Typ der chemischen Moietät, die verwendet wird, geeignet sein können. Wenn es erwünscht ist, kann eine "chemische Moietät" kovalent modifiziert werden, indem 5 Gruppen hinzugefügt oder entfernt werden, nachdem die Moietät auf einer physisch eigenen Entität angebracht worden ist.

Die chemischen Moietäten dieser Erfindung sind vorzugsweise "bioorganische Moleküle" von natürlichem oder 10 synthetischem Ursprung, dieselben können durch chemische, biochemische oder molekularbiologische Verfahren synthetisch hergestellt oder dupliziert werden, und dieselben können mit biologischen Systemen, z. B. Zellenrezeptoren, Immunsystemkomponenten, Wachstumsfaktoren, 15 Komponenten der extrazellulären Matrix, DNA und RNA und dergleichen interagieren. Die bevorzugten bioorganischen Moleküle zur Verwendung in den Arrays dieser Erfindung sind "Molekularsonden", die von Nukleinsäuren (oder Teilen derselben), Proteinen (oder Teilen derselben), Polysacchariden (oder Teilen derselben) und Lipiden (oder Teilen derselben), beispielsweise Oligonukleotiden, Peptiden, 20 Oligosacchariden oder Lipidgruppen ausgewählt sind, die bei der Molekularerkennung und einer affinitätsbasierten Bindungsuntersuchung (z. B. Antigen-Antikörper, Rezeptor-Ligand, Nukleinsäure-Protein, Nukleinsäure-Nukleinsäure, und dergleichen) verwendet werden können. Ein Array kann unterschiedliche Familien von bioorganischen Molekülen, z. B. Proteinen und Nukleinsäuren, enthalten, dasselbe wird jedoch typischerweise zwei oder mehrere 30 Spezies derselben Molekülfamilie enthalten, z. B. zwei oder mehr Sequenzen von Oligonukleotiden, zwei oder mehr Proteinantigene, zwei oder mehrere chemisch getrennte kleine organische Moleküle und dergleichen. Ein Array kann aus zwei Molekülspezies gebildet werden, obwohl es bevorzugt ist, daß das Array mehrere zehn bis zu Tausenden von Spezies von Molekülen umfaßt, und zwar vorzugsweise von etwa 50 bis zu etwa 1.000 Spezies. Jede Spezies kann natürlich in vielen Kopien vorhanden sein, wenn es erwünscht ist.

Ein "Analyt" ist ein Molekül, dessen Erfassung erwünscht ist, und das sich selektiv oder spezifisch an eine Molekularsonde bindet. Ein Analyt kann derselbe oder ein unterschiedlicher Molekültyp sein, wie es auch für die Moleküls- 40 sonde gilt, an die sich dasselbe bindet.

Die Schritte beim Aufbau eines Arrays durch das Verfahren dieser Erfindung sind in Fig. 1 diagrammatisch dargestellt.

Eine im wesentlichen planare "eigene physische Entität" (Schritt a, 1) wird mit chemisch reaktiven Gruppen (Schritt b, 3) derivatisiert. Diese Gruppen sind an Verbind- oder 50 Linker-Molekülen (Schritt c, 5) kovalent angebracht. Natürlich kann einer oder diese beiden Schritte umgangen werden, wenn geeignete Funktionalgruppen und/oder Verbind- oder Linker-Moleküle in den zur Verwendung ausgewählten Materialien inhärent 55 vorhanden sind. Die Verbind- oder Linker-Moleküle dienen als Anbringungsstellen für chemische Moietäten. Die Verbind- oder Linker-Moleküle werden in Kontakt mit einer Lösung oder mit Tröpfchen chemischer Moietäten gebracht. Nachdem das Binden zwischen den Bindern und den chemischen Moietäten stattgefunden hat, werden 60 nicht-reagierte Moietäten durch Abwaschen entfernt. Nicht-reagierte Binder werden behandelt, um sie chemisch inert bei aufeinanderfolgenden Arrayherstellungsschritten zu machen, und um ihre Fähigkeit zu minimieren, daß sie mit Analyten während aufeinanderfolgenden Untersuchungs- 65 verfahren interagieren. Diese Behandlung wird allgemein in dieser Anmeldung als "Abdecken" bezeichnet. Somit kann beispielsweise eine reaktive Aldehyd- oder Isothiocyanat-Gruppe mit einem Amin oder mit Ammoniak abgedeckt

werden, eine reaktive Epoxydgruppe kann mit einer sauren Lösung in ein Diol umgewandelt werden, usw. In einem Schritt (d) ist gezeigt, daß alle Binder an derselben Spezies einer chemischen Moietät (7) angebracht sind. Es sollte jedoch offensichtlich sein, daß mehr als eine Spezies einer chemischen Moietät mit einer speziellen Entität gebunden werden kann, je nachdem, wie es erwünscht ist. Das Material wird in einzelne Kacheln unterteilt (Schritt (e), 9). Die Unterteilung kann vor oder nach dem Schritt (b) stattfinden. In einem Schritt (f) werden Kacheln, die die gleiche oder unterschiedliche Spezies einer chemischen Moietät (allgemein bei 11 gezeigt) aufweisen, auf einem Träger (13) angeordnet, um ein Array zu bilden. Bei einem Ausführungsbeispiel der Erfindung, das in Fig. 2 gezeigt ist, sind die Kacheln (20) auf einem Träger (22) zylindrisch angeordnet. Der Träger kann ein fester Stab sein, an dessen Umfang Kacheln angeordnet sind, wie es hier gezeigt ist. Der Träger kann auch eine röhrenförmige Struktur sein, wobei die Kacheln auf der Außenoberfläche oder auf der Innenoberfläche der Röhre oder zwischen der Außen- und der Innenoberfläche angeordnet sind, wenn diese voneinander beabstandet sind. Weitere Variationen dieser Form sollen innerhalb des Bereichs dieser Erfindung sein.

Jedes Material kann als diskrete physische Entität verwendet werden, vorausgesetzt, daß es in der Lage ist, eine Unterteilung in Kacheln zu erlauben, daß es mit der Chemie, die zur Befestigung der chemischen Moietäten an der Oberfläche ausgewählt wird, kompatibel ist, und daß es mit dem Erfassungsverfahren der Untersuchung, in der das Array verwendet werden soll, optisch kompatibel ist. Beispiele geeigneter Materialien umfassen, jedoch ohne Begrenzung, Glas, Silizium und Kunststoff.

Ein Routineverfahren zum Derivatisieren einer Glas- oder Siliziumoberfläche zur Anbringung von Bindern besteht in dem Bilden von Siloxanverbindungen, und zwar unter Verwendung von Organosilanen, wie z. B. 3-Glycidoxypropyl-Trimethoxysilan ("GOPS"), 3-Aminopropyltriethoxysilan (APS) und dergleichen, deren chemische Eigenschaften bekannt sind. Das Bindermolekül kann eine bifunktionale Reagenz sein, die sich auf kovalente Art und Weise an die Oberfläche einer Gruppe und die chemische Moietät an die andere bindet. Alternativ kann der Verbinder eine Reagenz sein, die kovalent an der Oberfläche gebunden ist (z. B. Streptavidin), und an dem interessierenden Molekül durch eine nicht-kovalente Interaktion mit hoher Affinität (z. B. Biotin). Verfahren zum kovalenten Binden chemischer Moietäten an verschiedene Materialien zur Verwendung bei Affinitätsreinigungsprozeduren sind bekannt. Siehe im allgemeinen in *Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B. Methods in Enzymology*, Bd. 34, Hrsg. W.B. Jakoby, M. Wilchek, Acad. Press, NY (1974) und *Immobilized Biochemicals and Affinity chromatography, Advances in Experimental Medicine and Biology*, Bd. 42, Hrsg. R. Dunlap, Plenum Press, NY (1974). Die kovalente Anbringung von Oligonukleotiden an festen Trägern zur Verwendung bei Hybridisierungsuntersuchungen ist in Ghosh & Musso, *Nuc. Acids Res.* 15: 5353-5372 (1987) und Eggers u. a., *Bio Techniques* 17: 516-524 (1994) beschrieben. Natürlich müssen die angebrachten chemischen Moietäten in der Lage sein, frei mit Analyten in Bindungsuntersuchungen zu interagieren (z. B. ein angebrachtes Oligonukleotid muß in der Lage sein, frei an eine komplementäre Nukleinsäure zu hybridisieren, oder sich frei an ein sequenzspezifisches Protein zu binden, ein Antigen muß in der Lage sein, mit einem Antikörper zu interagieren, usw.).

Die chemischen Moietäten, die bei den Arrays dieser Erfindung verwendet werden sollen, sind bioorganische Moleküle, wie sie oben definiert wurden, mit Molekulargewich-

ten in dem Bereich von etwa mehreren hundert Dalton bis zu etwa mehreren hundert Kilodalton. Die Dichte von Molekülen, die an eine einzige physisch eigene Entität angebracht sind, soll in dem Bereich von etwa 1.000 bis zu etwa 100.000 Molekülen pro Quadratmikrometer Oberfläche sein. Verschiedene Verfahren können verwendet werden, um die Dichte von Molekülen auf Monolagen-Oberflächen zu messen. Die chemische Moietät kann beispielsweise mit einer hydrolysierbaren Gruppe versehen werden, die gespalten und gemessen wird, nachdem die Moietät an der Oberfläche angebracht ist, oder die chemische Moietät kann Etiketten oder Labels enthalten, die durch spektrometrische oder mikroskopische Techniken direkt meßbar sind. Diese Techniken und Messungen sind für Fachleute bekannt.

Die chemischen Moietäten sind in einer Lösung enthalten, die auf die Anbringungsoberfläche der Entität in der Form von Tröpfchen (siehe beispielsweise EP 0268237 als Beispiel für eine Vorrichtung, die zum Aufbringen und Drucken von Reagenzien geeignet ist) geliefert werden, oder die Lösung kann vorzugsweise in Kontakt mit der Oberfläche gehalten werden.

Es ist beabsichtigt, daß bestimmte der Arrays, die durch das Verfahren dieser Erfindung gebildet werden, mehrere Arrays von chemischen Moietäten aufweisen werden, die auf verschiedene Arten und Weisen gebildet werden können. Ein Array kann beispielsweise auf eine Kachel zur Platzierung in einem gekachelten Array gedruckt werden. Alternativ können mehrere Streifen von chemischen Moietäten, wobei jeder Streifen eine einzigartige Spezies einer chemischen Moietät enthält, auf einer eigenen physischen Entität aufgebracht werden, und die Entität kann in mehrere Kacheln geteilt werden, die jede der Spezies an einer bekannten Position auf den Kacheln enthalten.

Wie es oben angemerkt wurde, können die Kacheln auf irgendeine beliebige Art und Weise gebildet werden, die geeignet ist, um das Material zu unterteilen. Typischerweise wird das Material mit einer kommerziellen Chipzerteilungssäge auf die folgende Art und Weise zerteilt. Das Material wird auf einem Dünnschichtträger zur Befestigung an einer Unterdruckspannvorrichtung plaziert. Das Zerteilungsgerät ist mit Informationen über die Gestalt des zu schneidenden Materials, über die erwünschte Schneidetiefe und über die Geschwindigkeit der Bewegung der Unterdruckspannvorrichtung zu der Klinge hin (unter der Annahme, daß die Position der Klinge fest ist) programmiert. Das Material wird in einer ersten Richtung mit einer Metall- oder Diamant-versehene Klinge geschnitten, die sich bei einer Geschwindigkeit von etwa 20.000 Umdrehungen pro Minute dreht. Schneideabfälle, die durch das Schneiden erzeugt werden, können von der geschnittenen Oberfläche mit einem Strahl aus Luft, Gas oder Flüssigkeit weggerichtet werden. Das Material wird dann über einen erwünschten Winkel gedreht, wonach das Schneiden in einer zweiten Richtung fortgesetzt wird, bis die Bildung der Kacheln vollendet ist.

Das Array wird geformt, indem die Kacheln von dem Dünnschichtträger (siehe oben) auf einen Träger in einer stabilen vorbestimmten räumlichen Anordnung übertragen werden. Die Übertragung (die in dieser Anmeldung als "Aufnehmen und Plazieren" bezeichnet wird) kann mit Verfahren durchgeführt werden, die bei der Herstellung von integrierten Schaltungen und LEDs bekannt sind (siehe beispielsweise U.S.-Patent Nr. 5,256,792). Das folgende automatisierte Verfahren ist ein Beispiel für ein Roboterverfahren, das verwendet worden ist, um Kacheln, die Oligonukleotide und Proteine umfassen, eine zu einem Zeitpunkt auf einem Träger in einer stabilen räumlichen Anordnung aufzunehmen und zu plazieren. Eine einzelne Kachel, die auf einem Haftträger innerhalb eines x-y-Gitters liegt, wurde

mit Hilfe einer Kamera positioniert. Die Kachel wurde von der Unterseite ihres Haftträgers mit einer Nadel entnommen, mit einer Vakuumsonde aufgenommen, mit der Kamera noch einmal untersucht, mit einem x-y-Planarmotor zu einer vorbestimmten Position auf einem Träger bewegt und in einen Halter in dem Träger eingefügt. Vorzugsweise sind die Kacheln in einem kreisförmigen Muster angeordnet und werden durch Rillenkanäle, die innerhalb des Trägers gebildet sind, und nicht durch einen Haftstoff an ihrem richtigen Platz gehalten. Die Techniken zum Bilden von Mikrostrukturen, wie z. B. Taschen, Rillen oder Kanäle, um Kacheln an einem Träger anzubringen, sind in der Mikrotechnologie bekannt.

Die Arrays, die durch das oben beschriebene Verfahren gebildet werden, sollen in einer molekularerkennungs-basierten Untersuchung verwendet werden, bei der eine Probe, die ein Analyt enthält, dessen Erfassung erwünscht ist, in Kontakt mit einem Array von Molekülen bekannter Struktur oder Aktivität gebracht wird, die an vorbestimmten räumlichen Positionen auf einem Träger positioniert sind. Das Analyt wird durch ein Arraymolekül erkannt und bindet sich selektiv an dasselbe. Die Bindung ist von ausreichend hoher Affinität, um es zu ermöglichen, daß das Analyt durch das Arraymolekül gehalten wird, bis eine Erfassung des Analyts durchgeführt worden ist. Die selektive Erkennung könnte auf einer unterscheidenden physiochemischen Charakteristik des Analyts (z. B. einem Bereich mit einer speziellen Ladungsverteilung oder Polarität, welche durch ein Arraymolekül erkennbar sind), oder auf einem spezifischen chemischen Merkmal des Analyts (z. B. eine spezifische Primärsequenz in einer Nukleinsäure, einem Protein oder einem Polysaccharid, einer sekundären oder höherwertigen Angleichungsstruktur, oder einer spezifischen chemischen Gruppe oder Kombination von Gruppen, um eine aktive Stelle zu bilden) basiert sein. Es sei ins Auge gefaßt, daß die durch das Verfahren dieser Erfindung gebildeten Arrays nützlich sein werden, um chemische oder molekularbiologische Bibliotheken nach neuen therapeutischen Mitteln zu durchsieben, um Liganden für bekannte biologische Rezeptoren und neue Rezeptoren für bekannte Liganden zu identifizieren, um die ausgedrückten Gene zu identifizieren, um genetische Polymorphismen zu charakterisieren, um die menschliche Populationen für diagnostische und therapeutische Zwecke bezüglich ihres Genotyps darzustellen, und für viele weitere Verwendungen.

Beim Verwenden eines Arrays, das gemäß dem Verfahren dieser Erfindung gebildet ist, kann die Identität einer chemischen Moietät, die an ein Analyt an irgendeiner speziellen Stelle in dem Array gebunden ist, bestimmt werden, indem der Ort des Analyts erfaßt wird, und indem dieser mit einer Datei verbunden wird, die sich auf das Array bezieht, d. h. mit der Etikettendatei. Diese Etikettendatei ist eine Datei von Informationen, in der die Identität und Position jeder chemischen Moietät in dem Array, das sich auf die Datei bezieht, gespeichert ist. Es existieren verschiedene Verfahren zum Verbinden dieser Etikettendatei mit dem physischen Array. Die Etikettendatei könnte beispielsweise auf dem Array oder auf dem Gehäuse desselben mittels eines Siliziumchips, eines Magnetstreifens oder eines Strichcodes codiert sein. Alternativ könnten die Informationen, die das Array zu einer speziellen Etikettendatei identifizieren, in einem Array oder seinem Gehäuse enthalten sein, wobei die tatsächliche Datei in dem Datenanalysegerät oder in einem Computer, der mit dem Gerät kommuniziert, gespeichert ist. Die Verbindung der Etikettendatei mit dem physischen Array würde zum Zeitpunkt der Datenanalyse stattfinden. Eine andere Art und Weise zum Durchführen würde darin bestehen, die Etikettendatei in einem Gerät, wie z. B. einer Platte oder

Karte, zu speichern, die in das Datenanalysegerät vom Benutzer des Arrays zum Zeitpunkt, zu dem das Array in der Untersuchung verwendet wird, eingeführt werden kann.

Es sollte offensichtlich sein, daß die obige Beschreibung und die Beispiele die Erfindung darstellen sollen und Fachleute mit einer vollständigen Lehre und Beschreibung versehen, wie sie das Verfahren der Erfindung zu verwenden haben. Das Verfahren zum Bilden des Arrays kann auf viele Arten und Weisen variiert werden, welche eine Veränderung der Reihenfolge, in der die Schritte ausgeführt werden, der Auswahl der verwendeten Materialien, der Geometrie des Arrays, der Größe und Gestalt der Kacheln, der Verfahren zum Bilden eigener physischer Entitäten, die chemische Moietäten aufweisen, und zum Unterteilen dieser in Kacheln, und des Verfahrens des Aufnehmens, Plazierens und Immobilisierens von Kacheln auf einer Trägeroberfläche umfassen.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Bauen eines Arrays chemischer Moietäten (11) mit folgenden Schritten:

(a) Bilden einer Mehrzahl von Kacheln (9), wobei die Kacheln (9) eine im wesentlichen planare diskrete physische Entität (1) aufweisen, an der eine oder mehrere Spezies chemischer Moietäten (11) angebracht sind; und

(b) Aufnehmen und Plazieren der Kacheln (9) auf stabile Art und Weise auf einem Träger (13) an räumlich eigenen feststellbaren Orten, um ein Array von chemischen Moietäten (11) zu bilden, wobei das gebildete Array zumindest zwei Spezies einer chemischen Moietät (11) aufweist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Kacheln (9) einen Festkörper, ein Gel, eine Membran oder eine Kombination dieser Materialien aufweisen, wobei die Kacheln (9) mit einer Einrichtung (5) zum Anbringen einer chemischen Moietät an denselben angepaßt sind.

3. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem die Kacheln (9) gleichmäßig geformt sind und lineare oder radiale Abmessungen in dem Bereich von etwa 100 µm bis zu etwa 10 mm aufweisen.

4. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem die Kacheln (9) stabil auf einem Träger (13) durch Einführen in eine Tasche, die in demselben gebildet ist, plziert werden.

5. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem die Kacheln (9) auf einem Träger (13) mittels eines Haftstoffs plziert sind.

6. Verfahren nach Anspruch 3, bei dem die chemischen Moietäten in dem Array bioorganische Molekularsonden umfassen.

7. Verfahren nach Anspruch 6, bei dem die Sonden in einer Lösung enthalten sind, und bei dem die Lösung als Tröpfchen an vorbestimmten Orten auf der eigenen physischen Entität (1) für die Anbringung der chemischen Moietäten (11) an derselben aufgebracht wird.

8. Verfahren nach Anspruch 6, bei dem die Sonden in einer Lösung enthalten sind, wobei die Lösung in Kontakt mit der diskreten physischen Entität (1) für die Anbringung der chemischen Moietäten (11) an derselben plziert wird.

9. Verfahren nach Anspruch 6, bei dem die bioorganischen Molekularsonden aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus Nukleinsäuren oder Abschnitten derselben, aus Proteinen oder Abschnitten derselben, aus Polysacchariden oder Abschnitten derselben und aus Lipiden oder Abschnitten derselben besteht.

10. Verfahren nach Anspruch 9, bei dem das Array

von etwa 50 bis zu etwa 1.000 Spezies von Sonden umfaßt, wobei die Sonden an den Entitäten (1) in einer Dichte von etwa 1.000 bis zu etwa 100.000 Sonden pro Quadratmikrometer angebracht sind.

11. Verfahren nach Anspruch 9, bei dem die bioorganischen Moleküle Nukleinsäuren und Proteine sind. 5

12. Verfahren zum Bauen eines Arrays aus bioorganischen Molekularsonden zur Verwendung in einer Bindungsuntersuchung, wobei das Verfahren folgende Schritte aufweist: 10

(a) Bereitstellen einer Vielzahl von eigenen physischen Entitäten (1), die ein im wesentlichen planares unterteilbares Material aufweisen und mit Stellen (3) für die kovalente Anbringung einer bioorganischen Molekularsonde an denselben 15 versehen sind;

(b) Kontaktieren des Materials mit einer Molekularsonde eine ausreichende Zeit lang, um die Sonde an dem Material anzubringen;

(c) Entfernen nicht-reagierter Sondenmoleküle und Abdecken nicht-reagierter Anbringungsstellen; 20

(d) Unterteilen des Materials in gleichmäßig geformte Kacheln (9) mit linearen oder radialen Abmessungen von etwa 250 µm bis zu etwa 25 1.000 µm; und

(e) Aufnehmen und Plazieren der Kacheln (9) auf stabile Art und Weise auf einem Träger (13) an einer getrennten und eigenen räumlichen Position, wodurch ein Array von Molekularsonden gebildet 30 wird, wobei das Array von etwa 50 bis zu etwa 1.000 Spezies von Sonden aufweist.

13. Array mit zumindest zwei Spezies einer chemischen Moietät (11), das durch das Verfahren nach Anspruch 1 gebildet ist, mit folgenden Merkmalen: 35

(a) einem Träger (13); und

(b) einer Vielzahl von Kacheln (9), wobei die Kacheln (9) eine im wesentlichen planare eigene physische Entität (1) aufweisen, an der eine oder mehrere Spezies einer chemischen Moietät (11) an räumlich getrennten feststellbaren Positionen angebracht ist bzw. sind. 40

14. Array gemäß Anspruch 13, das ferner eine Einrichtung zum Codieren der räumlichen Position und Identität jeder chemischen Moietät in dem Array aufweist. 45

15. Array gemäß Anspruch 13 oder 14, bei dem die chemische Moietät (11) eine bioorganische Molekularsonde aufweist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Nukleinsäuren oder Abschnitten derselben, aus Proteinen oder Abschnitten derselben, aus Polysacchariden oder Abschnitten derselben und aus Lipiden oder Abschnitten derselben besteht. 50

16. Array gemäß einem der Ansprüche 13 bis 15, bei dem die eigenen physischen Entitäten (1) gleichmäßig geformte Kacheln (9) mit linearen oder radialen Abmessungen in dem Bereich von etwa 100 µm auf einer Seite bis zu etwa 10 mm auf einer Seite aufweisen. 55

17. Array gemäß Anspruch 16, bei dem die eigenen physischen Entitäten (1) in einem spiralförmigen oder kreisförmigen Muster auf dem Träger (13) angeordnet sind. 60

18. Array gemäß Anspruch 16, bei dem die eigenen physischen Entitäten (1) in einem rechteckigen Muster auf dem Träger (13) angeordnet sind. 65

19. Array gemäß Anspruch 16, bei dem die eigenen physischen Entitäten (1) eine zylindrische Anordnung auf dem Träger (13) aufweisen.

20. Array gemäß Anspruch 16, bei dem eine oder mehrere der eigenen physischen Entitäten (1) aus einem Array von bioorganischen Molekularsonden besteht.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

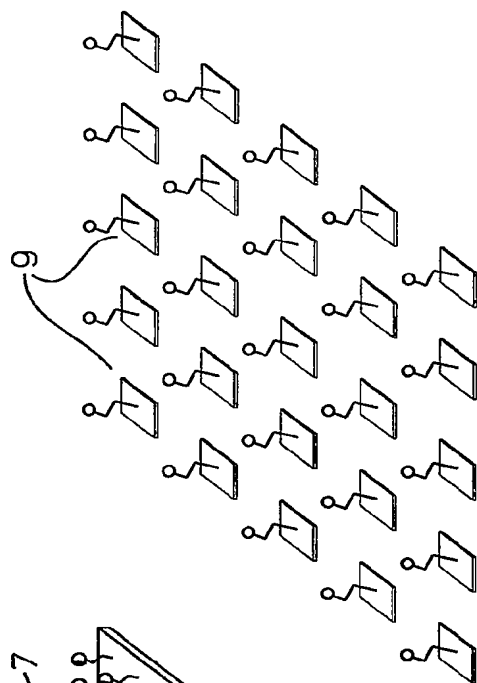


FIGURE 1a FIGURE 1b FIGURE 1c FIGURE 1d

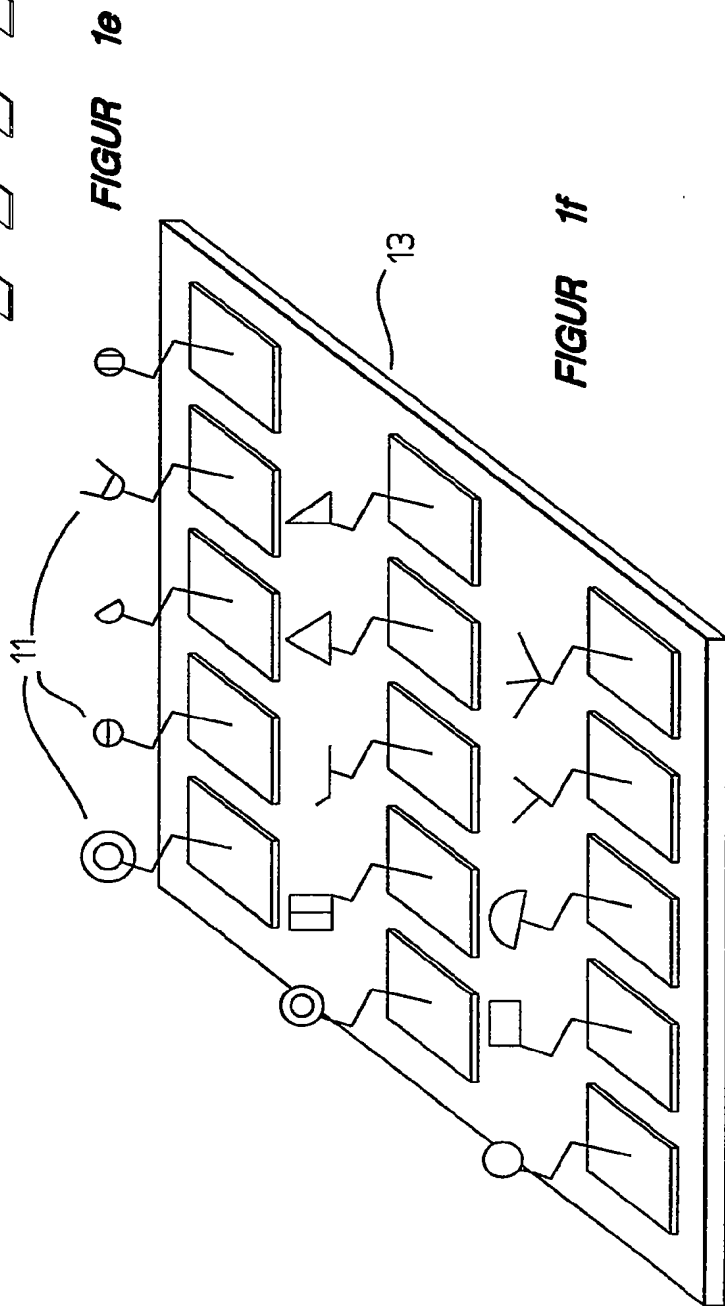
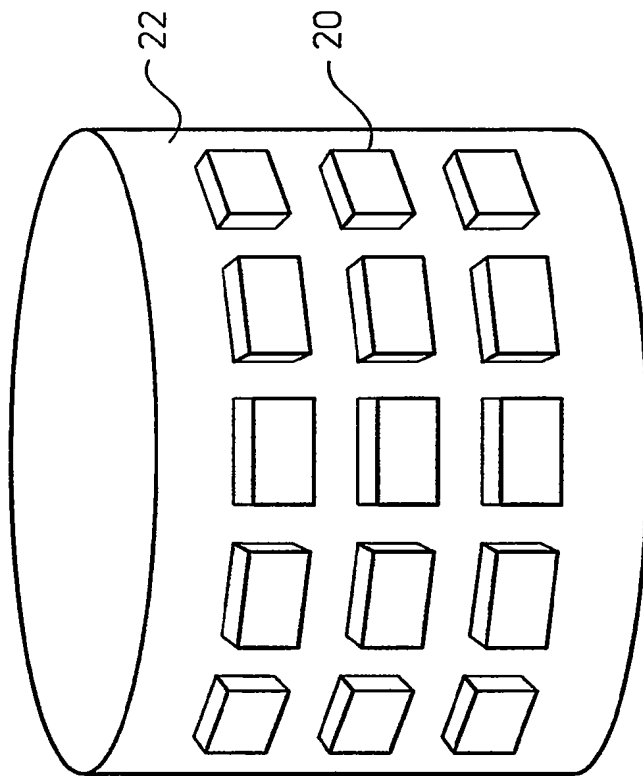


FIGURE 1e FIGURE 1f



FIGUR 2